

На правах рукописи

Темесген Белайхун Кибрет

**АУТОАНТИТЕЛА К ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
БОЛЬНЫХ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ
С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2007

Работа выполнена на кафедре биохимии государственного образовательного Учреждения высшего профессионального образования Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ишмухаметова Диляра Галимовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Рауис Госманович (заведующий кафедрой
микробиологии, вирусологии и иммунологии,
Казанская государственная Академия
ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана)

кандидат биологических наук Уразов Наиль Гумерович
(заведующий отделом культивирования и идентификации
вирусов Республиканского центра по борьбе со СПИД и ИБ МЗ
РТ, г. Казань)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Защита состоится 22 марта 2007 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного Совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КГУ, аудитория 209.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан февраля 2007г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета д.б.н.

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По современным представлениям о природе иммунитета основным назначением иммунной системы является защита организма от внешней и внутренней биологической агрессии. Развитие защитной реакции связано со способностью иммунной системы распознавать чужеродные для данного организма макромолекулы и отличать их от собственных антигенов. С другой стороны, известно, что иммунная система в норме обладает потенциальной способностью вырабатывать антитела к большинству собственных антигенов и в сыворотке крови здоровых людей (Добродеева, Суслوнова 1990, Несвижский и др., 1988, Lacroix-Desmazes et al., 1998) и интактных животных (Poverenny et al., 1966) всегда присутствует небольшой уровень аутоантител к собственным антигенам. Нарушение механизмов иммунорегуляции может привести к развитию аутоиммунных процессов в организме с повышением содержания в сыворотке крови аутоантител (ААТ) к собственным антигенам организма, что обычно сопровождается патологическими изменениями в различных органах и тканях (Spartz et al., 1997; Christen et al., 2004). Для большинства аутоиммунных заболеваний (АИЗ) характерно повышение содержания в сыворотке крови ААТ к нативной и (или) денатурированной ДНК, что рассматривается как один из диагностических признаков аутоиммунных заболеваний (Arbuckle et al, 2001; Gill et al., 2003; Sherer et al., 2004).

На различных моделях аутоиммунных патологий продемонстрирована возможность активного участия ААТ к ДНК в развитии заболевания (Сучков и др., 2001, Robin et al., 2006). Показано, что ААТ к ДНК проникают в клетки (Koren et al., 1995; Reichlin et al., 1995), перекрестно реагируя с рецепторами клеточной мембраны, способны запускать апоптоз (Paul et al., 2002). Они обладают цитотоксической активностью (Sasaki et al, 1991, Kramers et al., 1994; Neslin et al., 1998; Kozyr et al., 2002), которая коррелирует с их ДНК-гидролизующей активностью (Сучков и др., 2006). Имеются прямые доказательства повреждающего действия ААТ к ДНК при СКВ на ткань

клубочков почек (Morioka, 1996; van Bruggen et al, 1997; Witte et al., 1998; Limaye, Mohan, 2004; Zeng et al., 2004).

В последние годы появились сведения об обнаружении признаков аутоиммунных процессов при вирусных заболеваниях, которые не относятся к АИЗ (Hansen et al., 1998). Повышение содержания в сыворотке крови ААТ к компонентам собственных клеток и тканей, в том числе к ДНК, выявлено в сыворотке крови при вирусном гепатите (Pawlotsky et al., 1994), при ВИЧ (Massabki et al., 1997; Zandman-Goddard, Shoenfeld, 2002), вирусном энцефалите (Гармашова и др., 2004), парвовирусной инфекции (Kerr et al., 1996).

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая РНК-содержащими хантавирусами (Raftery, 2002; Miyamoto et.al, 2003; Lednicky, 2003), является одним из опасных, характеризующихся высокой летальностью, вирусных заболеваний. Для ГЛПС характерно поражение многих органов и систем, в особенности почек, вследствие повреждения сосудов микроциркуляторного русла (Сиротин, 1994). Одним из основных факторов повреждения почек при ГЛПС являются циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), содержащие, наряду с антителами к вирусу, различные продукты гиперактивации иммунной системы, в том числе аутоантитела к собственным антигенам (Сомова-Исачкова и др., 2003).

В литературе отсутствуют сведения по характеристике спектра аутоантител при ГЛПС, и, неизвестно, присутствуют ли у больных ГЛПС в сыворотке крови и в составе ЦИК ААТ к ДНК. Принимая во внимание данные литературы о повышении уровня содержания ААТ к ДНК при многих вирусных инфекциях, мы предполагаем, что при инфицировании хантавирусами в сыворотке крови больных также могут появиться ААТ к ДНК, которые способны вносить существенный вклад в развитие нефропатии как у больных СКВ (Gaynor et al., 1997, Сучков и др., 2005). Выяснение возможности участия ААТ к ДНК в развитии ГЛПС является одним из подходов для понимания роли ААТ к ДНК при вирусных инфекциях и поиска новых методов лечения.

Цель исследования: выяснить возможность участия аутоантител к нативной и денатурированной ДНК в развитии геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Были поставлены следующие задачи:

- определить уровень содержания IgG и IgM ААТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц;
- выделить из индивидуальных образцов сыворотки крови больных ГЛПС и здоровых лиц циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) и выяснить присутствие в них ААТ к ДНК методом ИФА;
- исследовать ДНК-гидролизующую активность ААТ в сыворотке крови больных ГЛПС;
- выделить из сыворотки крови очищенные фракции IgG ААТ к ДНК методом аффинной хроматографии на ДНК-сорбентах и определить их удельную ДНК-связывающую активность.

Научная новизна

В работе впервые исследованы ААТ к ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС и дана их характеристика.

Во всех исследованных образцах сыворотки крови больных ГЛПС, в отличие от здоровых лиц, выявлена ДНК-абзимная активность, характерная для цитотоксических ААТ к ДНК.

Обнаружено, что уровень содержания IgM и IgG ААТ к дДНК в сыворотке крови больных ГЛПС достоверно превышает уровень их содержания в сыворотке крови здоровых лиц.

Установлен ранее неизвестный факт присутствия ААТ к ДНК в составе ЦИК в сыворотке крови больных ГЛПС.

Практическая значимость

Обнаруженное в работе достоверное повышение уровня содержания ААТ к дДНК в сыворотке крови больных ГЛПС по сравнению с уровнем их содержания у здоровых лиц может иметь важное клинико-диагностическое значение. Присутствие ААТ к ДНК в составе ЦИК у больных ГЛПС указывает

на то, что эти аутоантитела вовлечены в патогенез заболевания, что необходимо учитывать при выборе стратегии иммунокоррекции при ГЛПС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлено, что в сыворотке крови больных ГЛПС присутствуют ААТ к нативной и денатурированной ДНК. Уровень содержания IgG и IgM ААТ к денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС достоверно превышает уровень их содержания в сыворотке крови здоровых лиц.
2. Выявленные существенные различия свойств ААТ к ДНК сыворотки крови больных ГЛПС и здоровых лиц, свидетельствуют о потенциальной возможности участия ААТ к ДНК в развитии заболевания.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение».- Казань, 2005; 9-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века».- Пущино, 2005; 10-ой Международной Пущинской школе- конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века».- Пущино, 2006; X всероссийском научном форуме «Дни иммунологии».- Санкт-Петербург, 2006; а также на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета в 2004-2005 гг.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 117 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения с 25 рисунками и 10 таблицами, выводов и списка цитируемой литературы с 155 наименованиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились образцы сыворотки крови больных ГЛПС, находившихся на стационарном лечении в городской клинической инфекционной больнице г. Казани. Диагноз установлен на основании

клинических и серологических данных. В качестве контроля использовали образцы сыворотки крови практически здоровых людей, проходящих плановые медицинские осмотры в лечебных учреждениях г. Казани, не страдающих аутоиммунными заболеваниями. В качестве положительного стандарта при определении ААТ к ДНК использовали сыворотки крови больных СКВ из республиканской клинической больницы № 2 г. Казани.

Содержание ААТ к ДНК определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), оптимизированным ранее в нашей лаборатории (Саттарова и др., 1994). В качестве антигена использовали нДНК эритроцитов цыплят ("Reanal", Венгрия), о нативности ДНК судили по величине гиперхромного эффекта. Денатурированную ДНК (нДНК) получали методом термической денатурации. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой антитела против иммуноглобулинов человека ("Сорбент Лтд", Россия). Уровень ответа цветной реакции ИФА измеряли на спектрофотометре "Multiscan" ("Flow", Великобритания) при длине волны 492нм (ОП₄₉₂).

Для стандартизации результатов всей серии экспериментов каждый раз параллельно анализировали одну и ту же положительно реагирующую с ДНК сыворотку крови больных СКВ с высоким содержанием ААТ к ДНК, обозначенный как "стандарт". Содержание ААТ к ДНК в сыворотке крови выражали в относительных единицах (отн.ед.), которые вычисляли, как отношение ОП₄₉₂опыт/ОП₄₉₂ стандарт. Для анализа выборок индивидуальных значений уровня содержания ААТ к ДНК применяли структурное среднее – медиану и коэффициент асимметрии (Акберова, 2004б; Лакин, 1990). Достоверность различий оценивали с использованием непараметрических ранговых критериев Краскелла-Уоллиса и Манна-Уитни (Акберова, 2004а).

Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) из сыворотки крови выделяли методом преципитации ПЭГ-6000 на 0,1М боратном буфере, рН 8,4 (Фримель, 1987). Для определения ААТ к нДНК и дДНК в составе ЦИК их диссоциировали добавлением 0,1М боратного буфера рН 10,2 с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 часа (Tarnacka et. al., 2002).

Для определения ДНК-гидролизующей активности ААТ в качестве субстрата использовали коммерческий препарат ДНК плазмиды pBR322 («СибЭнзим», Россия). Образцы сывороток крови, в которых определяли абзимную активность, предварительно прогревали при 56°C в течение 40 минут для инактивации сывороточных ДНКаз.

Гидролиз плазмидной ДНК проводили в течение 15 часов при 37°C с отбором аликвот из реакционной смеси через определенные интервалы времени. Для оценки ДНКазной активности продукты реакции подвергали электрофорезу в 0,7% агарозном геле («Serva», Германия) согласно методике Shuster и др. (Shuster et al., 1992). Окрашивание гелей проводили в растворе этидия бромиды и фотографировали в проходящем УФ-свете (Гааль др., 1982) в системе Gel-Imager-2 (Вектор Бест, Россия). Для вычисления количественного соотношения форм ДНК в гидролизате использовали программу Scion Image (Pio et al, 1998).

Выделение из сыворотки крови и получение фракций, обогащенных IgG ААТ кДНК включало в себя осаждение иммуноглобулинов сульфатом аммония, гель-фильтрацию на колонке с акрилексом Р-200 (Остерман, 1985), концентрирование (мембранные конусы «Amicon», США), диализ (кассеты «Pierce», США). Ионообменную хроматографию проводили на QAE-сефадексе (Леках и др., 1997), и аффинную хроматографию - на ДНК-целлюлозе. Фракции собирали с помощью коллектора фракций Multirac с оптической системой («LKB», Швеция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами исследовано методом ИФА содержание ААТ классов IgG и IgM к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови 60 больных ГЛПС и 25 здоровых лиц. На рис. 1 представлена частота встречаемости индивидуальных значений содержания IgG ААТ к нДНК (А) и дДНК (Б). Из рисунка видно, что группа больных и здоровых лиц в целом не отличаются по распределению индивидуальных уровней содержания ААТ к нДНК (рис.1, А).

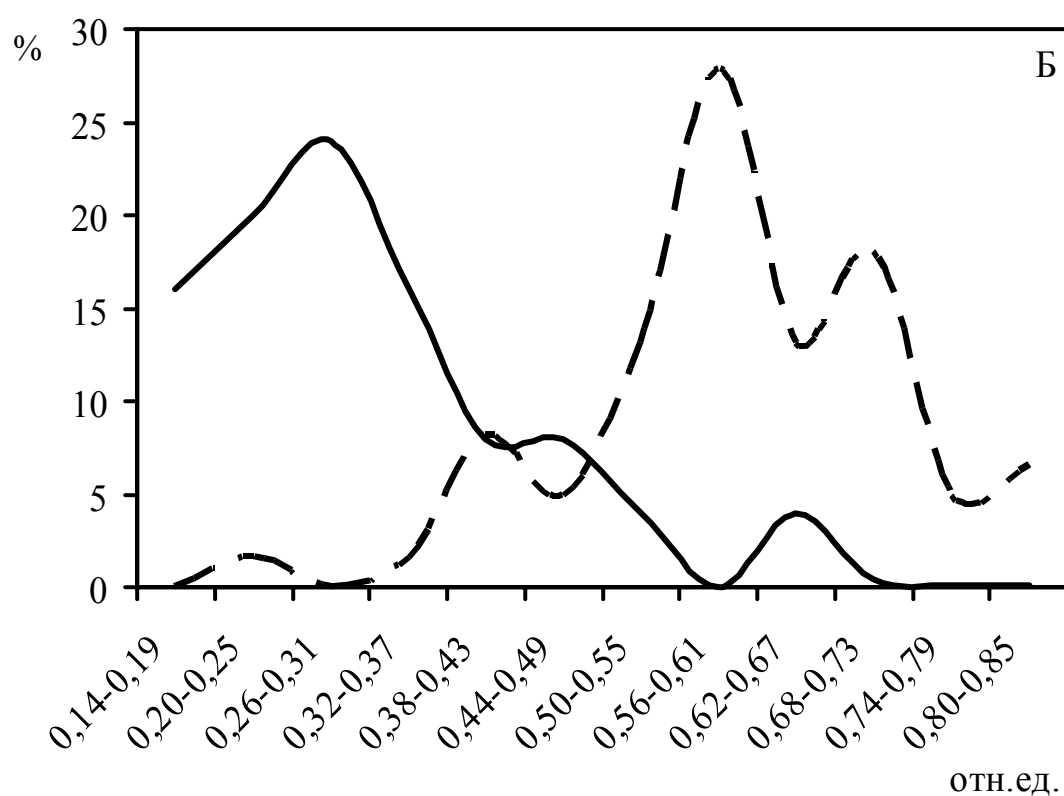
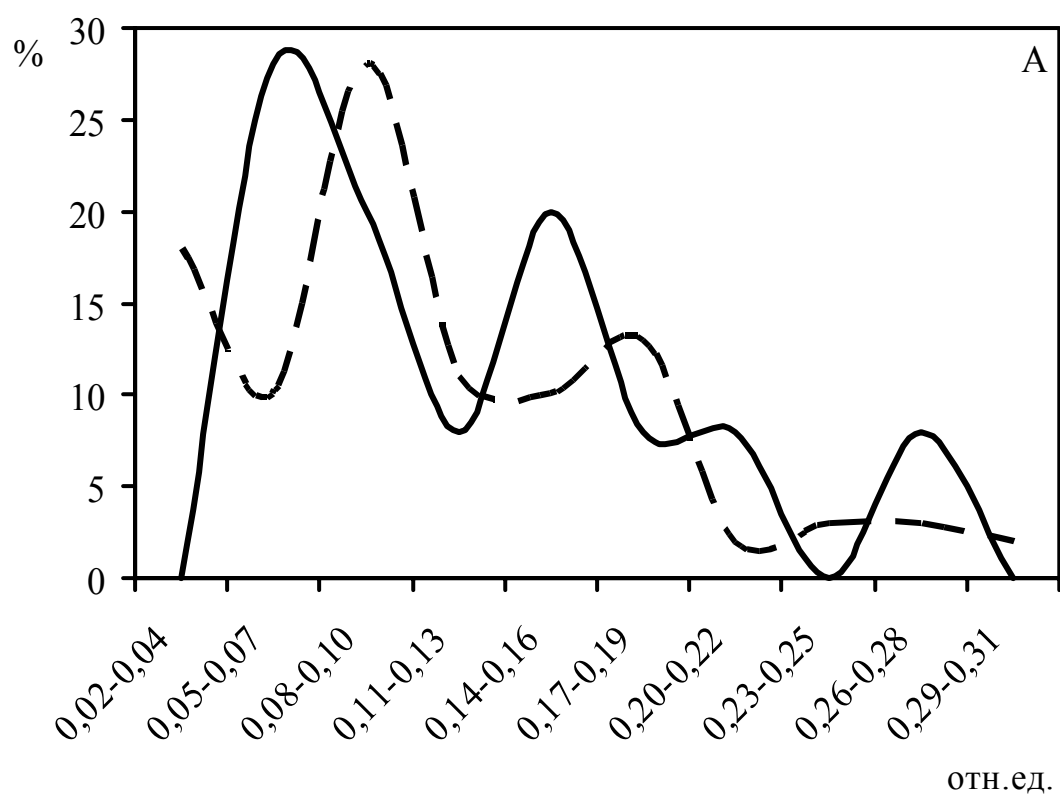


Рис. 1. Частота встречаемости индивидуальных уровней содержания IgG ААТ к нДНК (А) и дДНК (Б) в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц (в % от обследованных) (- - - - ГЛПС, ——— здоровые)

В случае ААТ к дДНК (рис. 1, Б) у большинства здоровых лиц уровень содержания ААТ к дДНК не превышает 0,45 отн. ед., в то время как у больных содержанием ААТ к дДНК находится в основном в пределах 0,45- 0,85 отн. ед.

В группе больных ГЛПС среднее значение содержания ААТ к нДНК по медиане составляет 0,10, то есть близко к норме, и 95% индивидуальных значений не превышает пороговые пределы данного показателя в норме (рис.2). Совершенно иная картина выявляется при сравнении уровня содержания ААТ к дДНК в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц. Средний уровень содержания ААТ к дДНК по медиане у больных ГЛПС составляет 0,60 отн.ед., что в 2 раза превышает аналогичный показатель у здоровых лиц. У больных ГЛПС 50% индивидуальных показателей содержания ААТ к дДНК (между 25-м и 75-м перцентилями) находятся в пределах 0,52-0,69, что достоверно превышает пороговые значения нормы.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что инфицирование человека хантавирусом и последующее развитие ГЛПС сопровождаются активацией аутоиммунных процессов в организме и усилением продукции ААТ к дДНК.

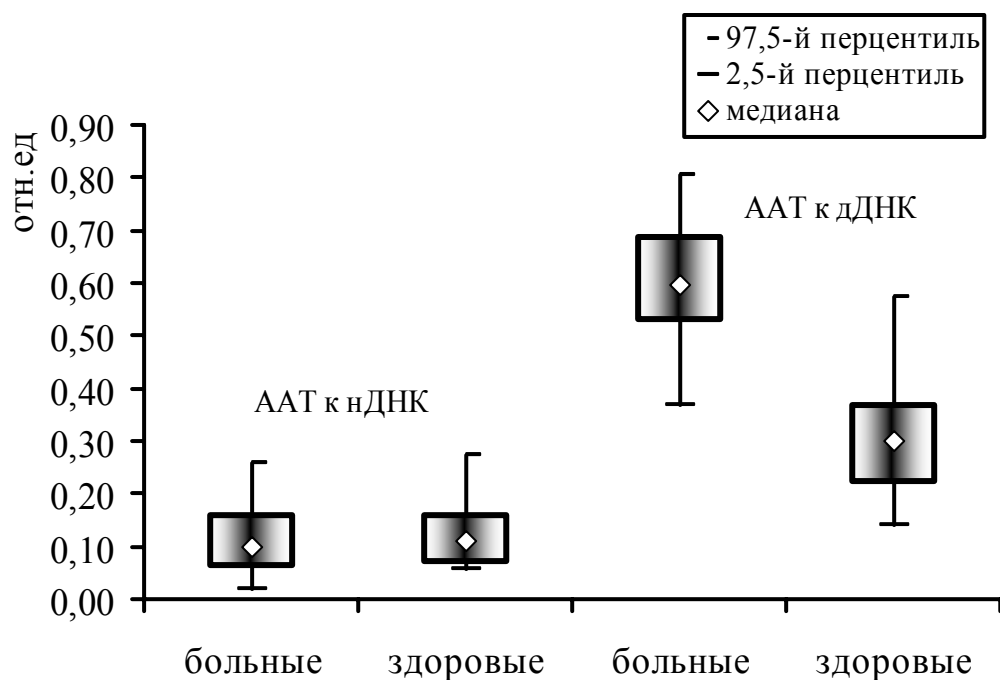


Рис. 2. Уровень содержания IgG ААТ к ДНК у больных ГЛПС и здоровых лиц

В литературе имеются данные, косвенно указывающие на возможность участия в регуляции аутоиммунных процессов при вирусных инфекциях ААТ к ДНК, принадлежащих к классу IgM (Boes et al., 2000). В связи с этим нами исследованы уровни содержания IgM ААТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц (рис.3).

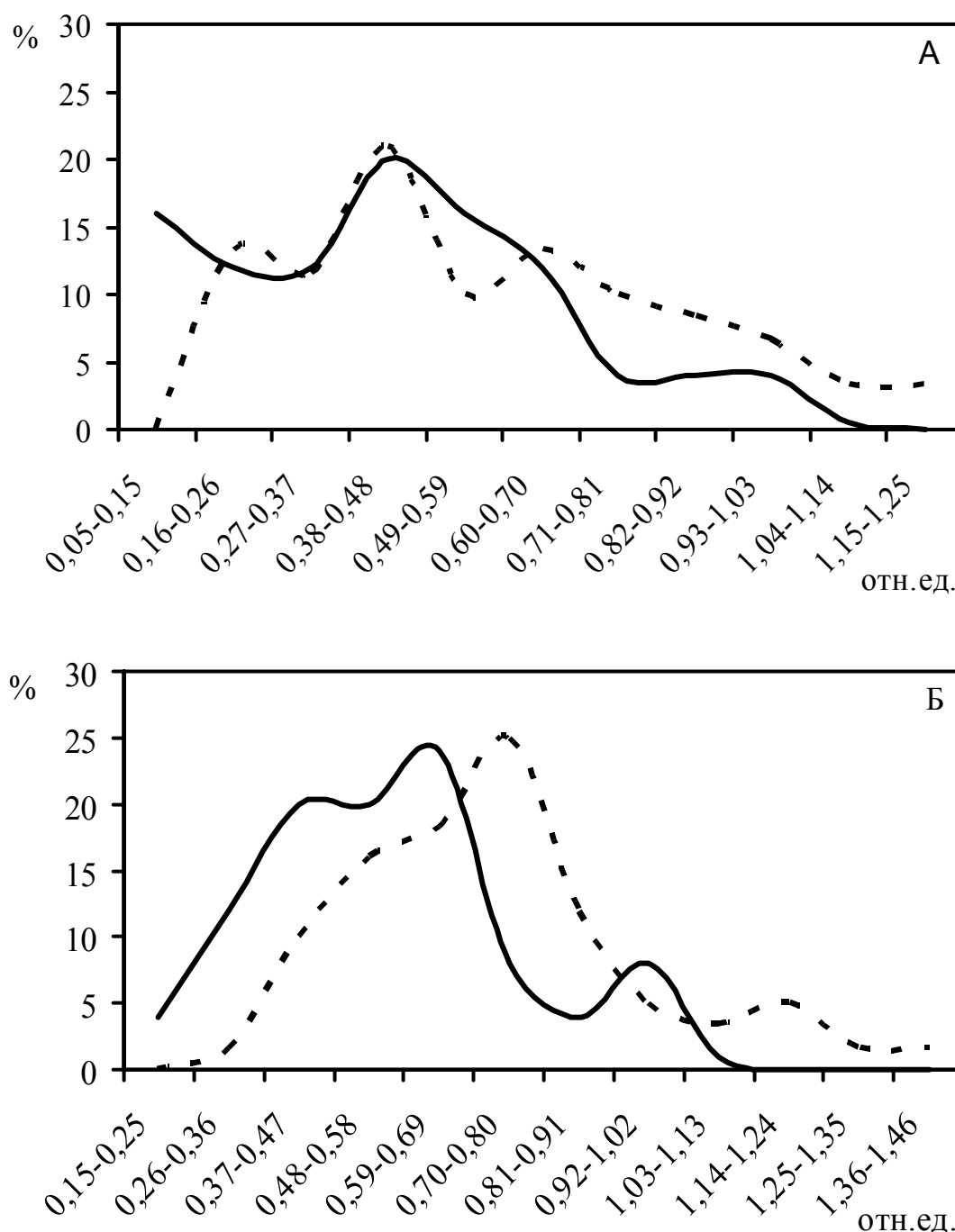


Рис. 3. Частота встречаемости индивидуальных уровней содержания IgM ААТ к нДНК (А) и дДНК (Б) в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц (в % от обследованных)(- - - - ГЛПС, ----- здоровые)

Встречаемость различных уровней индивидуальных значений содержания IgM ААТ к нДНК (рис. 3, А) в группах больных ГЛПС и здоровых лиц сходна. Частота встречаемости уровней содержания IgM ААТ к дДНК (рис. 3, Б) в группе больных заметно смещена в область более высоких значений.

Средние уровни содержания IgM ААТ к нативной и денатурированной ДНК, рассчитанные по медиане и перцентилям, представлены на рис. 4. Различия средних значений содержания IgM ААТ к нДНК в сыворотке крови больных ($0,53 \pm 0,27$) и здоровых лиц ($0,41 \pm 0,25$) недостоверны. По ААТ к дДНК средний уровень IgM ААТ у больных ($0,71 \pm 0,22$) достоверно превышает средний уровень IgM ААТ к дДНК у здоровых лиц ($0,57 \pm 0,19$).

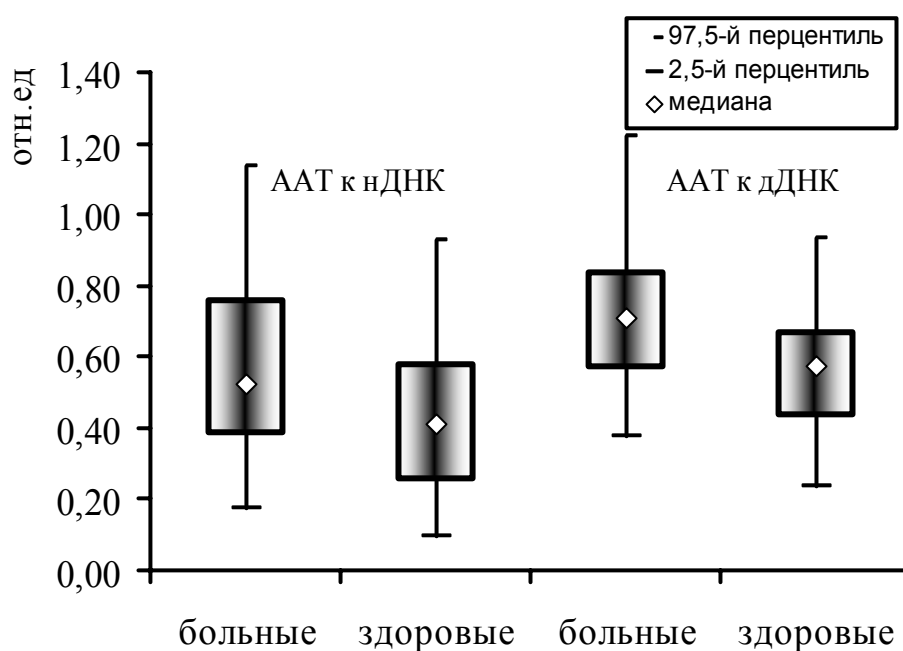


Рис. 4. Уровень содержания IgM ААТ к ДНК у больных ГЛПС и здоровых лиц

В связи с возможностью участия IgM ААТ в регуляции аутоиммунных процессов, представляло интерес выяснить корреляционную связь между содержанием IgG и IgM ААТ к ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС. По зависимости уровня содержания IgG ААТ к нДНК от IgM группы больных можно разделить на 2 подгруппы. В первой из них, которая составляет 43,3 %

от обследованных лиц, выявляется прямая корреляция, во второй подгруппе (33.3%) - обратная (коэффициенты корреляции 0,51 и - 0,51 соответственно). Неоднородность группы может быть связана как с индивидуальными особенностями так и с тем, что пациенты находятся на разных стадиях заболевания. Положительная корреляция ($r=0,58$) IgG и IgM ААТ к дДНК наблюдается у 58% больных ГЛПС, что указывает на более тесную взаимосвязь IgG и IgM аутоантител к дДНК. Эти данные указывают на возможность участия IgM в усилении синтеза IgG ААТ к дДНК. Они не согласуются с результатами авторов, которые показали, что IgM способствуют снижению интенсивности аутоиммунных процессов (Boes et al., 2000). Мы полагаем, что взаимосвязь IgG и IgM неоднозначна и зависит от многих других факторов, прежде всего, от стадии развития заболевания.

Известно, что ГЛПС является иммунокомплексной патологией, и повреждению мелких сосудов способствуют иммунные комплексы (Сомова - Исачкова и Плехова, 2003). Мы предполагаем, что в повреждении сосудистой системы почек при ГЛПС могут участвовать ИК, содержащие цитотоксические ААТ к ДНК как это показано при СКВ (Nezlin et al., 1999; Zeng et al, 2004). В литературе отсутствуют какие-либо сведения о присутствии ААТ к ДНК в составе ЦИК при ГЛПС.

Уровень содержания ЦИК в сыворотке крови определяли методом осаждения ПЭГ-6000 с некоторыми модификациями (Golda et. al., 2004). Среднее значение содержания ЦИК в сыворотке крови больных ГЛПС ($0,21 \pm 0,11$) достоверно превышает ($p < 0,05$) средний уровень их содержания у здоровых лиц ($0,08 \pm 0,07$).

Наличие IgG ААТ к нативной и денатурированной ДНК в составе ЦИК исследовали в 34 образцах сыворотки крови больных ГЛПС. Из образцов сыворотки выделяли ЦИК (Фримель, 1987), после диссоциации определяли в них ААТ к ДНК методом ИФА. В составе ЦИК, выделенных из сыворотки крови больных ГЛПС, обнаруживаются ААТ как к нДНК, так и к дДНК, основная часть ААТ к ДНК представлена аутоантителами к дДНК (рис.5).

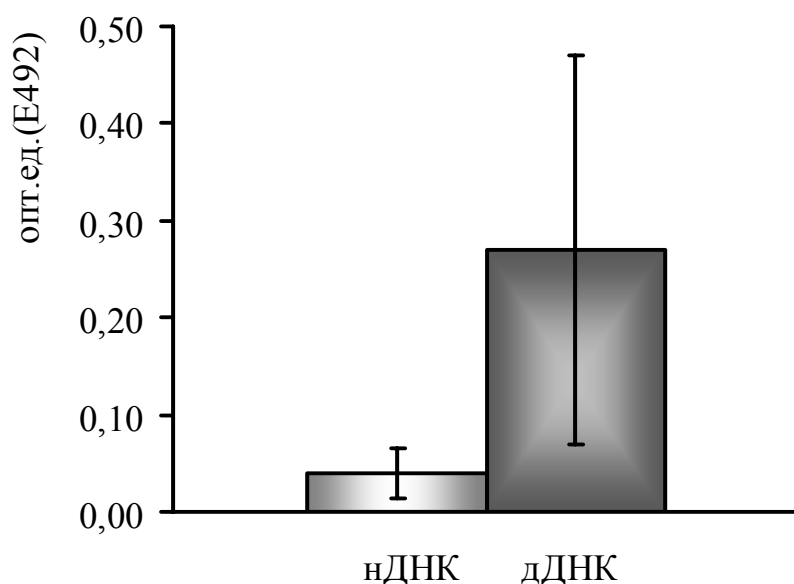


Рис. 5. Уровень содержания ААТ к ДНК в ЦИК у больных ГЛПС (n = 34)

Нами исследована зависимость содержания ААТ к нативной и денатурированной ДНК в составе ЦИК от уровня их содержания в образцах сыворотки крови больных ГЛПС. Существует прямая зависимость уровня содержания ААТ к дДНК в ЦИК от их содержания в сыворотке крови (рис.6, Б). В отношении ААТ к нДНК корреляция выражена слабо (рис.6, А). Это свидетельствует о том, что присутствие ААТ к ДНК в составе ЦИК не является артефактом и отражает уровень содержания ААТ к ДНК в сыворотке крови.

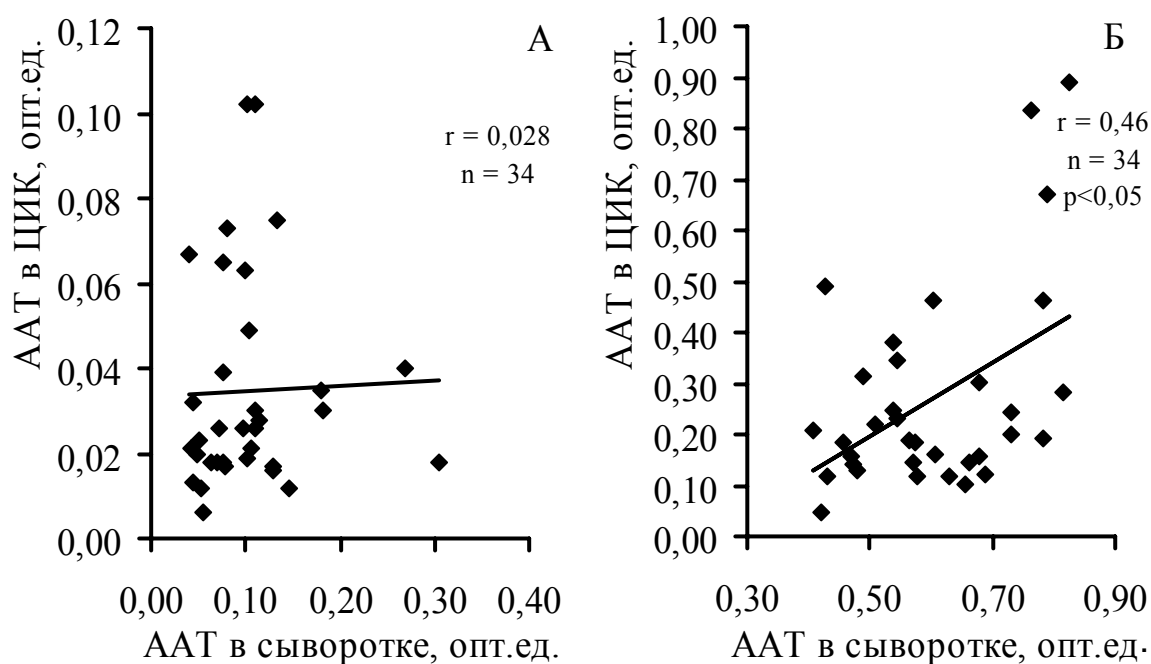


Рис. 6. Зависимость уровня содержания ААТ к нДНК (А) и дДНК (Б) в ЦИК от их содержания в сыворотке крови больных ГЛПС

Присутствие в составе ЦИК при ГЛПС ААТ к ДНК указывает на возможность их участия в развитии почечного синдрома по механизму прямого цитотоксического действия ААТ к ДНК на эндотелиальные клетки микроциркуляторного русла почек.

Известно, что цитотоксическая активность ААТ к ДНК коррелирует с их абзимной активностью (Kozug et al., 2002). В связи с этим нами исследована абзимная активность в сыворотке крови 16 больных ГЛПС и 16 здоровых лиц. Во всех исследованных 16 сыворотках крови больных ГЛПС обнаружена ДНК-абзимная активность. В 4 из 16 образцов сыворотки крови здоровых лиц также выявлена небольшая абзимная активность. На рис. 7 представлена одна из электрофореграмм с результатами исследования абзимной активности сыворотки крови больных ГЛПС и здоровых доноров. Все 5 образцов сыворотки крови больных ГЛПС проявляют ярко выраженную ДНКазную активность, превращая суперспирализованную (сс) ДНК в кольцевую форму (дорожки 9-13), как и сыворотка крови больной СКВ (дорожка 8). При инкубации с образцами сыворотки крови здоровых лиц (дорожки 2-6) основная часть ссДНК сохраняется. Из 5 образцов сыворотки крови здоровых лиц в двух выявляется ДНКазная активность (дорожка 4 и 5).

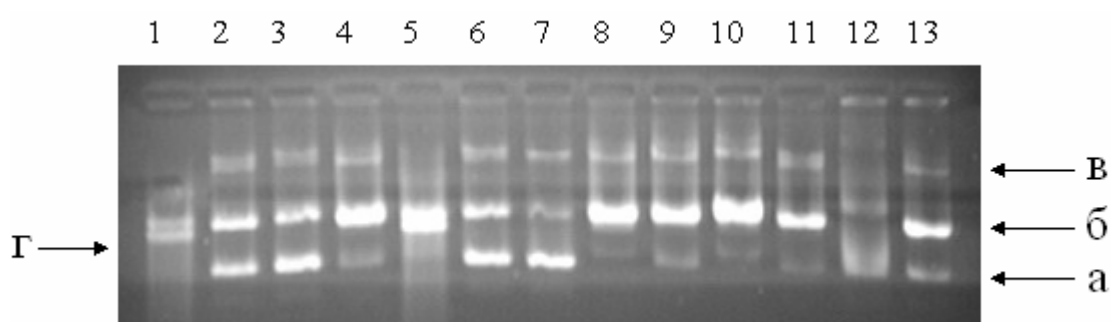


Рис.7. Электрофореграмма продуктов гидролиза ДНК плазмиды pBR322 после ее 15-часовой инкубации с сыворотками крови больных ГЛПС и здоровых лиц (1- негретая, ГЛПС; 2-6, норма; 7- контроль (ДНК pBR322); 8-СКВ; 9-13, ГЛПС (а–суперспирализованная; б – кольцевая; в – катенаны; г – линейная)

Это можно объяснить наличием у них скрытых аутоиммунных процессов. Об обнаружении абзимной активности в некоторых образцах сыворотки крови здоровых доноров сообщают и другие авторы (Власов и др., 1999).

На рис. 8(А) представлены результаты анализа продуктов гидролиза плазмидной ДНК в динамике с отбором проб через 0, 4, 6 и 8 часов ее инкубации с сывороткой крови. Через 4 часа инкубации с сывороткой крови ГЛПС 80% ссДНК превращается в кольцевую форму, при инкубации с сывороткой крови здорового донора за это время лишь 30% плазмидной ДНК превращается в кольцевую форму.

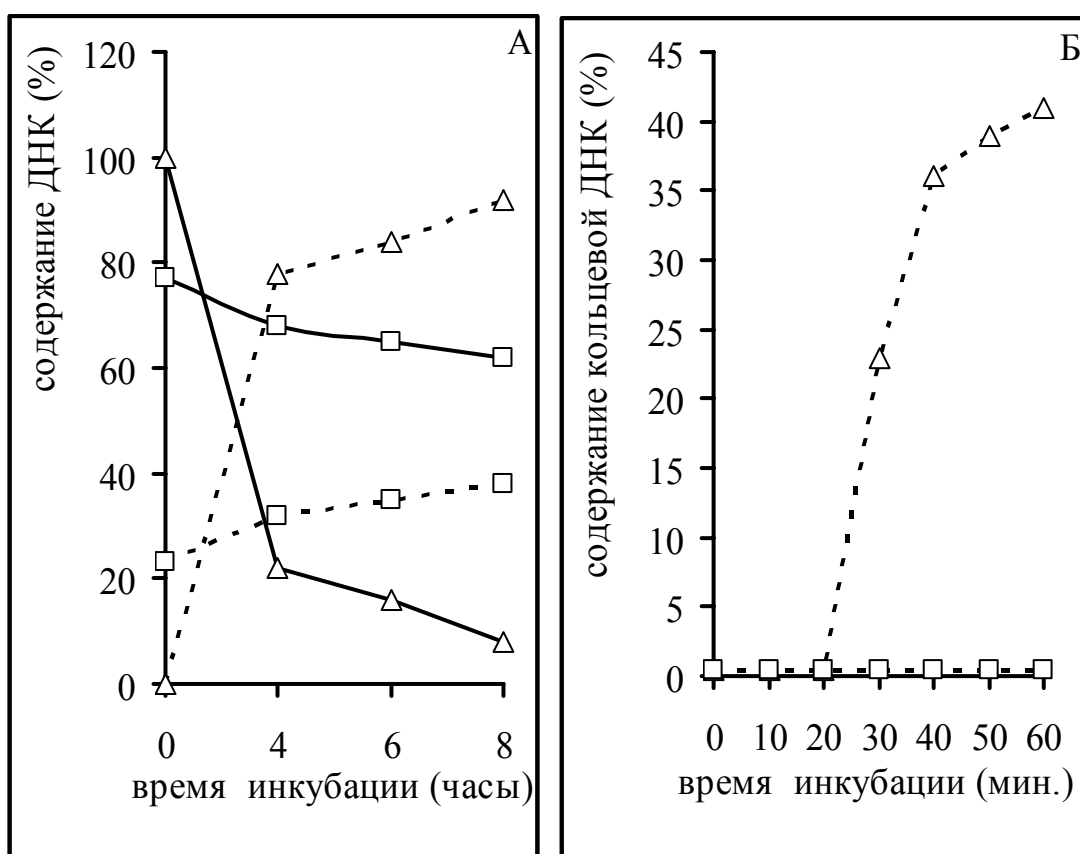


Рис.8. Динамика гидролиза плазмидной ДНК при инкубации с сывороткой крови (Δ - ГЛПС, \square - здоровый донор)

— суперспирализованная ДНК, --- кольцевая форма ДНК

Различие абзимной активности в сыворотке крови больных ГЛПС и здоровых лиц особенно четко выявляется при исследовании динамики превращения ссДНК в кольцевую форму при краткосрочной инкубации плазмидной ДНК с образцами сыворотки крови (рис.8, Б). Уже в первые 30 минут инкубации с сывороткой крови больного ГЛПС более 20% плазмидной ДНК превращается в кольцевую форму, а через 60 минут количество кольцевой формы ДНК превышает 40%. За это время абзимная активность сыворотки крови здорового донора еще не проявляется.

Аутоантитела к ДНК в сыворотке крови могут находиться как в свободном так и в “скрытом” состоянии, что связано с их способностью связываться с неродственными антигенами, образуя низкоаффинные комплексы. Скрытые аутоантитела можно выявить методом ионообменной хроматографии на колонке с QAE-сефадексом (Леках и др., 1991, Saenko et al., 1992). Поэтому перед фракционированием на ДНК-сорбентах иммуноглобулины, выделенные из сыворотки крови, предварительно подвергали процедуре очистки на QAE-сефадексе. Фракцию иммуноглобулинов элюировали 1М NaCl, диализовали против буфера А, концентрировали и наносили на колонку с ДНК-сорбентом (Сизякина и др., 1996).

На рис.9 представлены результаты аффинной хроматографии иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки крови здоровых лиц (А) и больных ГЛПС (Б) на дДНК-сорбенте. Не связывающиеся с сорбентом неспецифические белки (фракция I) удаляли буфером А (0,01М трис-HCl, 0,12М NaCl, 0,002М ЭДТА, pH 7,2). Прочно связанные с сорбентом ААТ к ДНК элюировали 0,1 М глициновым буфером pH 2,3 (фракция II). При последующей промывке сорбента буфером А элюируются следовые количества кислых белков (фракция III). Как видно из рисунка, прочно связывающаяся с дДНК сорбентом фракция ААТ к дДНК у больных ГЛПС (рис 9,Б) значительно более выражена по сравнению со сходной фракцией у здоровых лиц (рис 9,А). Хроматографические профили на нДНК сорбенте иммуноглобулинов,

выделенных из сыворотки крови здоровых лиц и больных ГЛПС, были идентичными (данные не представлены).

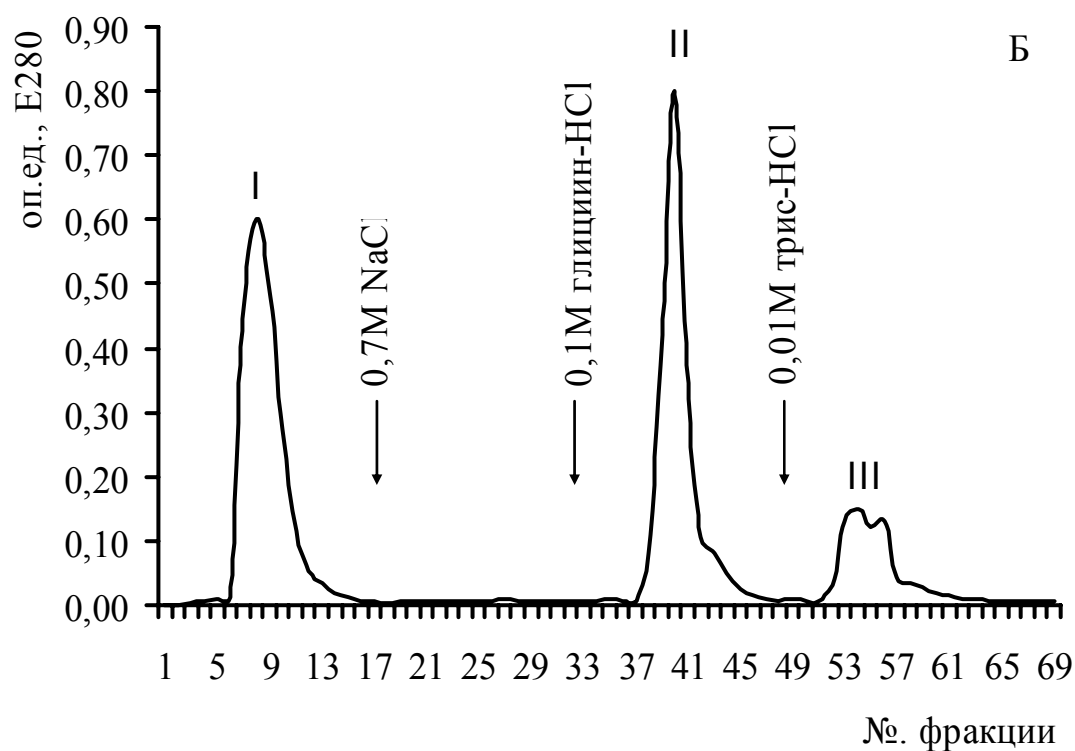
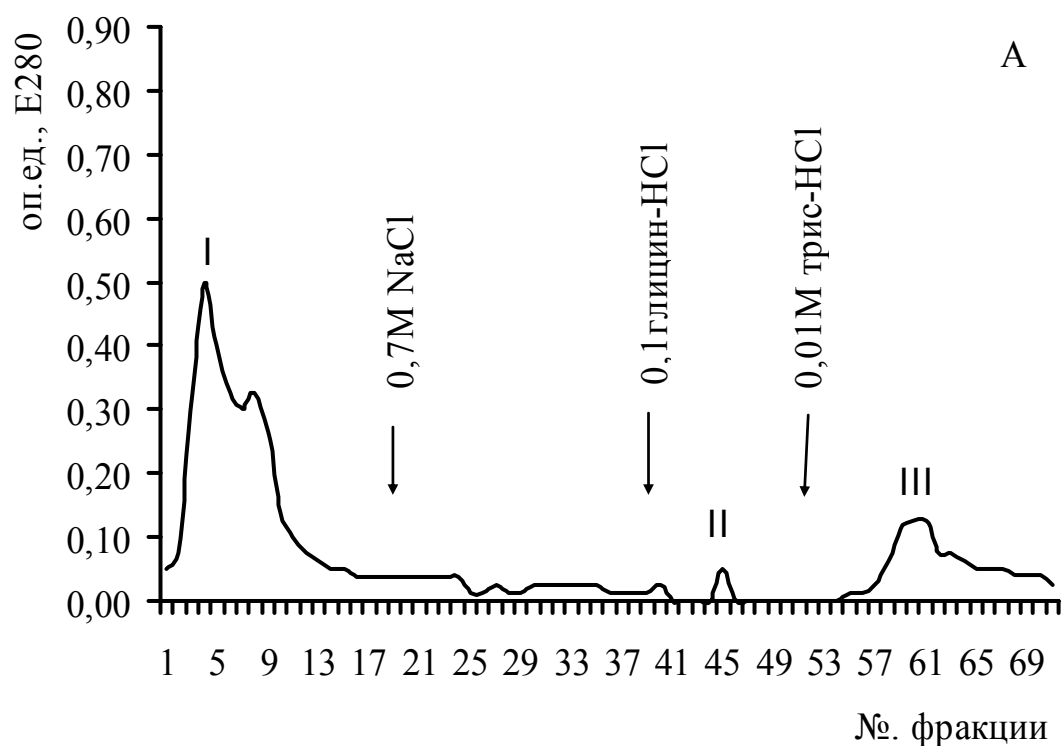


Рис. 9. Аффинная хроматография фракции IgG сыворотки крови здоровых (А) и больных ГЛПС (Б) на дДНК-целлюлозе

Результаты определения в очищенных фракциях ААТ к дДНК методом ИФА показали, что удельная активность ААТ к дДНК у больных ГЛПС в 2,5 раза выше по сравнению со здоровыми донорами (рис10).

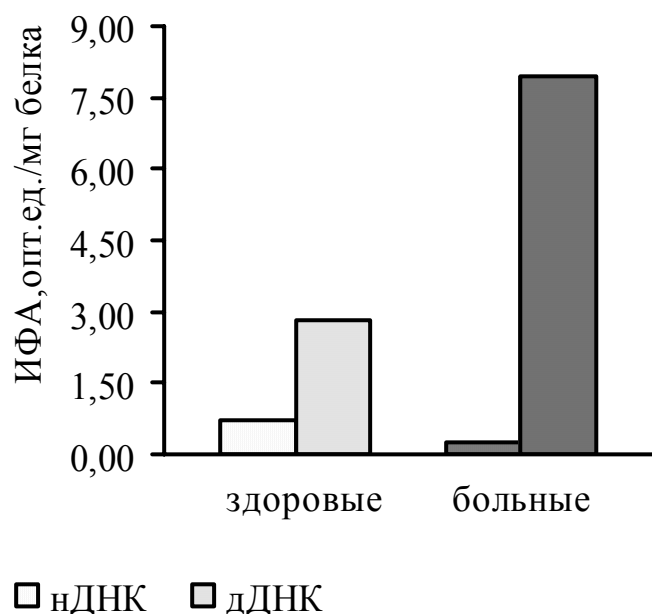


Рис. 10. Удельная активность ААТ к нДНК и дДНК в очищенных IgG фракциях

Таким образом, результаты аффинной очистки аутоантител на ДНК-сорбентах подтверждают полученные нами ранее на цельных сыворотках данные о повышении содержания ААТ к дДНК в сыворотке крови при развитии ГЛПС.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотке крови больных ГЛПС обнаружены ААТ к нативной и денатурированной ДНК, принадлежащие к IgG и IgM изотипам. Уровень содержания ААТ к нативной ДНК близок к значениям данного показателя в группе здоровых лиц. Средний уровень содержания IgG ААТ к денатурированной ДНК в сыворотке крови больных ГЛПС в 2 раза превышает уровень их содержания в сыворотке крови здоровых лиц.

2. У 58% обследованных больных выявлена положительная корреляция между содержанием ААТ к дДНК классов IgG и IgM. Для ААТ к нДНК у 43 % больных корреляция между содержанием IgG и IgM носит положительный, а у

33% - отрицательный характер, что, повидимому, связано с различиями в стадиях развития заболевания.

3. Из сыворотки крови больных ГЛПС и здоровых лиц методом аффинной хроматографии на ДНК-сорбентах выделена фракция IgG ААТ к дДНК. Удельная дДНК связывающая активность этой фракции аутоантител при ГЛПС значительно выше по сравнению с соответствующей фракцией у здоровых лиц.

4. В составе циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), выделенных из образцов сыворотки крови больных ГЛПС обнаружены ААТ к нативной и денатурированной ДНК, что свидетельствует о возможности прямого участия этих аутоантител в развитии нефрита при отложении ЦИК в микроциркуляторном русле почек.

5. Во всех исследованных сыворотках крови больных ГЛПС, в отличие от здоровых лиц, выявлена ДНК-абзимная активность, характерная для цитотоксических ААТ к ДНК, что является дополнительным подтверждением возможности участия ААТ к ДНК в повреждении почек при ГЛПС.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Коннова Н.В. Аутоантитела к ДНК в сыворотке крови при рассеянном склерозе / Н.В. Коннова, **Б.К. Темесген**, Д.Г. Ишмухаметова // Материалы XIII международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С.48-49.

2. **Темесген Б.К.** Аутоиммунный компонент у больных геморрагической лихорадкой / **Б.К. Темесген**, Д.Г. Ишмухаметова // 9-я Международная пушинская школа–конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушино, 2005. – Тезисы докладов. – С.172.

3. **Темесген Б.К.** Аутоантитела к ДНК класса IgM в сыворотке крови больных геморрагической лихорадкой / **Б.К. Темесген**, О.В. Власова, Д.Г. Ишмухаметова // 10-я Международная пушинская школа–конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушино, 2006. – Тезисы докладов. – С.165.

4. Ишмухаметова Д.Г. ДНК–абзимы в сыворотке крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом / Д.Г. Ишмухаметова, **Б.К. Темесген.**, Л.Р. Гизатуллина, В.Х. Фазылов // X всероссийский научный форум «Дни иммунологии» – Санкт– Петербург, 2006. Сборник тезисов. – Медицинская иммунология. – 2006. – Т.8. – №. 2-3. – С.267-268.

5. Ишмухаметова Д.Г. Аутоантитела к РНК в сыворотке крови здоровых людей и опухоленосителей / Д.Г. Ишмухаметова, А.С. Зайнуллина, **Б.К. Темесген** // Ученые записки Казан. гос. ун–та. – 2006. – Т. 148. – Кн.2. – С.73-82.

6. Ишмухаметова Д.Г. Аутоантитела к ДНК в сыворотке крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом / Д.Г. Ишмухаметова, **Б.К. Темесген**, О.В. Власова, Ф.А. Бабушкина // Медицинская иммунология. – 2006. – Т.8. – №.5-6. – С653-658.